

The Effect of Tetrahydrocannabinol on Acetylcholinesterase Enzyme Activity and Anxiety-Like Behaviors in Laboratory Rat

Nafiseh Shafiei¹, Gholam Hossien Riazi^{2*}, Fatemeh Daneshmand³

¹Department of Biochemistry, Faculty of Basic Sciences, Payame Noor University, Yazd, Iran.

²Department of Biochemistry, Institute of Biochemistry & Biophysics (IBB), University of Tehran, Tehran, Iran.

³Department of Biology, Payame Noor University, Yazd, Iran.

*Corresponding Author:
Gholam Hossain Riazi,
Department of Biochemistry,
Institute of Biochemistry &
Biophysics (IBB), University
of Tehran, Tehran, Iran.

Email:
ghriazi@ut.ac.ir

Received: 12 Dec, 2017

Accepted: 26 Feb, 2018

Abstract

Background and Objectives: Tetrahydrocannabinol (THC) is a psychoactive substance that affects the central nervous system. Acetylcholinesterase enzyme, as one of the enzymes of central and peripheral nervous system, plays a role in the sympathetic and parasympathetic function. This enzyme transmits neural messages through hydrolysis of acetylcholine in the cholinergic synapses and is of great importance in memory and learning. In this study, the effect of THC was investigated on the cholinergic system in rat behaviors.

Methods: In this experimental study, 10 adult male rats were used. First, the rats were anesthetized, then, two cannulas were placed in the ventricle using stereotaxic apparatus and THC was injected. The activity of the acetylcholinesterase enzyme was measured, and plus maze test was used to assess the anxiety behavior. Data were analyzed using t-student test.

Results: In this study, THC reduced the activity of acetylcholinesterase enzyme, indicating memory impairment. Moreover, the percentage of time spent in the open arm and the percentage of the number of entries into the open arm increased ($p < 0.05$), and corticosterone levels increased, which both indicated an increase in anxiety.

Conclusion: The results of this study showed that THC causes changes in memory and anxiety behaviors by impairing cholinesterase enzyme activity and neurotransmitter secretion.

Keywords: Dronabinol; Maze learning; Acetylcholinesterase; Anxiety.

اثر تتراهیدروکانابینول بر روی فعالیت آنزیم استیل کولین استراز و رفتارهای اضطرابی در موش آزمایشگاهی

نفسه شفیعی^۱، غلامحسین ریازی^{۲*}، فاطمه دانشمند^۳

چکیده

زمینه و هدف: تتراهیدروکانابینول، ماده روان گردانی است که بر روی سیستم اعصاب مرکزی تأثیر می‌گذارد. آنزیم استیل کولین استراز به‌عنوان یکی از آنزیم‌های سیستم اعصاب مرکزی و محیطی، در عملکرد سمپاتیک و پاراسمپاتیک نقش دارد. این آنزیم با هیدرولیز استیل کولین در سیناپس‌های کولینرژیک سبب انتقال پیام عصبی می‌شود و از اهمیت ویژه‌ای در حافظه و یادگیری برخوردار است. در این مطالعه اثر تتراهیدروکانابینول (THC) بر سامانه کولینرژیک در رفتارهای موش بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، از ۱۰ رت نر بالغ استفاده شد. ابتدا رت‌ها بیهوش شده، سپس با استفاده از دستگاه استریوتاکسی دو کانول، در ناحیه بطن قرار گرفتند و ماده THC تزریق گردید. فعالیت آنزیم استیل کولین استراز، اندازه‌گیری و از تست ماز به‌علاوه‌ای شکل برای سنجش رفتار اضطرابی استفاده شد. داده‌ها به کمک آزمون تی‌استیودنت تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: در این مطالعه THC، فعالیت آنزیم استیل کولین استراز را کاهش داد که بیان‌کننده اختلال حافظه بود. همچنین درصد زمان حضور در بازوی باز و درصد تعداد ورود به بازوی باز افزایش نشان داد ($p < 0.05$)، و میزان هورمون کورتیکوسترون افزایش داشت که هر دو نشان‌دهنده افزایش اضطراب بود.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج این مطالعه، تتراهیدروکانابینول با اختلال در فعالیت آنزیم کولین استراز و ترشح انتقال‌دهنده‌های عصبی سبب تغییر در حافظه و رفتار اضطرابی می‌شود.

کلید واژه‌ها: درونابینول؛ ماز آموزشی؛ استیل کولین استراز؛ اضطراب.

^۱گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، یزد، ایران.

^۲گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوفیزیک و بیوشیمی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

^۳گروه بیولوژی، دانشگاه پیام نور، یزد، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

غلامحسین ریازی؛ گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:

ghriazi@ut.ac.ir

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Shafiei N, Riazi GhH, Daneshmand F. The effect of Tetrahydrocannabinol on Acetylcholinesterase enzyme activity and anxiety-like behaviors in laboratory rat. *Qom Univ Med Sci J* 2018;12(8):1-9. [Full Text in Persian]

تاریخ دریافت: ۹۶/۹/۲۱

تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۷

مقدمه

روش بررسی

تتراهیدروکانابینول (THC- Δ^9)، ترکیب اصلی گیاه کانابیس و ماده‌ای روان‌گردان است (۱). مصرف کانابیس سبب هیپوترمی، بیش‌فعالی، مهار ترشح پرولاکتین و تحریک ترشح هورمون آدنوکورتیکوترپین می‌شود (۲،۱). تتراهیدروکانابینول به گیرنده کانابینوئیدی خود در مناطق مختلف مغز متصل و با تغییر در جذب انتقال‌دهنده‌های عصبی بر حافظه، رفتار و متابولیسم مغز تأثیر می‌گذارد (۳). دو دسته از گیرنده کانابینوئیدی به نام CB1 و CB2 شناسایی شده‌اند (۴)، این گیرنده‌ها به خانواده G پروتئین تعلق دارند (۵)، و به‌طور وسیعی در هاپیوکامپ، کورتکس، آمیگدال و بازال گانگلیا دیده می‌شوند که اعمال فیزیولوژیک و رفتاری کانابینوئیدها به‌واسطه این گیرنده‌ها بروز می‌کند (۴).

در این مطالعه تجربی، از ۱۰ رت نر بالغ نژاد ویستار (با محدوده وزنی ۳۰۰-۲۵۰ گرم) با سن ۸-۷ هفته استفاده شد. حیوانات یک‌هفته قبل از آزمایش در اتاق مخصوص حیوانات و تحت شرایط استاندارد (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای 22 ± 1) با آب و غذای کافی نگهداری شدند. آزمایش در ساعت معین انجام شد و حیوانات به دو گروه شامل: گروه سالیین و گروه THC تقسیم شدند که با توجه به تعداد نمونه‌های انتخاب‌شده در کارهای مشابه، در هر گروه ۵ حیوان قرار گرفت (۹)، در ادامه، بعد از جراحی بر روی رت‌ها و بهبودی آنها، به گروه سالیین، سالیین و به گروه THC، تتراهیدروکانابینول (با دوز ۸۰ میکروگرم برکیلوگرم) تزریق شد.

استرس‌های روانی بر ساختار لیمبیک که از مهم‌ترین آنها می‌توان به هاپیوکامپ، آمیگدال، هیپوتالاموس و سپتم اشاره کرد، اثر گذاشته و پاسخ‌های هیجانی را فرا می‌خواند. این پاسخ‌ها با تغییراتی در سیستم‌های نورآدرنژیک، سروتونرژیک، محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - آدرنال (HPA) موجب ایجاد پاسخ‌های سازگارانه می‌شوند (۶).

ماده مورد استفاده در این مطالعه، تتراهیدروکانابینول بود که در محلول ۱٪ توئین ۸۰، حل و در سالیین به حجم یک میکروگرم برکیلوگرم رسید (۱۰). حیوانات به‌وسیله تزریق داخل صفاقی کتامین هیدروکلراید (۵ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن بدن) و زایلازین (۱ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن بدن) بیهوش شدند. رت‌ها در دستگاه استریوتکس (Stoelting, USA) قرار گرفتند و با استفاده از اطلس پاکسینوس، مناطق داخل بطنی تعیین گردید.

محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - آدرنال (HPA) بر حافظه تأثیر داشته و با تغییر در میزان فعالیت این محور، میزان حافظه نیز دچار تغییر می‌شود. از جمله هورمونی که در حافظه دخالت به‌سزایی دارد می‌توان به هورمون محور HPA، یعنی کورتیکوسترون اشاره کرد (۷). آنزیم استیل کولین استراز، یکی از آنزیم‌های سیستم اعصاب مرکزی است که در راه‌های کولینرژیک به میزان وسیع دیده می‌شود و مسئول هیدرولیز استیل کولین در سیناپس‌های کولینرژیک بوده که برای کنترل انتقال پیام عصبی ضروری است (۸)؛ بدین ترتیب در اعمال ضروری سیستم عصبی مرکزی مانند شکل‌پذیری سیناپسی، تصمیم‌گیری، یادگیری، حافظه و غیره تأثیر می‌گذارد (۸). در واقع، اختلال عملکرد آنزیم کولین استراز می‌تواند به اختلالات شناختی با آسیب عمده بر اختلال حافظه منجر گردد.

مختصات داخل بطن در اطلس پاکسینوس به شرح زیر است:

۰/۹ میلی‌متر به سمت عقب از برگما، ۱/۵ میلی‌متر به سمت راست از خط وسط و ۳/۶ میلی‌متر زیر سطح قشر مغز.

با استفاده از دستگاه استریوتاکس، دو کانول (۲۳G) به طول ۱۳ میلی‌متر در داخل سوراخ‌هایی که قبلاً به‌وسیله مته ایجاد شده بود، قرار گرفت. کانول‌ها با استفاده از سیمان دندانپزشکی بر سطح مجسمه محکم شدند و برای جلوگیری از بسته شدن آنها، یک سیم نازک استریل در داخل آن‌ها گذاشته شد. بعد از جراحی، به حیوانات ۵ روز استراحت داده شد تا استرس و تخریب بافتی احتمالی که به‌وسیله جراحی صورت گرفته از بین برود و حیوان به حالت عادی خود برگردد. سپس تزریق داخل بطنی با استفاده از یک سرسوزن ۳۰ دندانه‌شکی با کمک سرنگ هاملتون و رابط پلی‌اتیلن ۱۰ با حجم ۵ میکرو انجام شد. تست، ۵ دقیقه بعد از تزریق داخل بطنی صورت گرفت.

این تحقیق با هدف بررسی اثر THC بر فعالیت آنزیم استیل کولین استراز و رفتارهای اضطرابی در موش آزمایشگاهی انجام شد.

محلول همگن به دست آمده با دور ۳۰۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد و مایه رویی در بالای ساکارز ۱/۲ مولار شیب ساکارز قرار گرفت و با دور ۱۱۳۰۰۰g دور به مدت ۳۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. لایه سفید وسط نرم بین لایه ساکارز از ۰/۳۲ مولار و ۱/۲ مولار به دست آمده در بالای ساکارز ۰/۸ مولار لایه گذاری و با دور ۱۱۳۰۰۰g به مدت ۳۵ دقیقه سانتریفوژ شد و در ادامه، رسوب حاوی سیناپتوزوم در سوکروز ۰/۳۲ مولار حل گردید. در نهایت، سیناپتوزوم در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شد.

میکروگراف TEM، به منظور بررسی مورفولوژی سیناپتوزوم گرفته شد (۱۲، ۱۳). محلول سیناپتوزوم در دور ۹۰۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی به دست آمده در پلیت ۲/۵٪ گلو تار آلدنید به مدت ۱/۵ ساعت نگه داشته شد، سپس نمونه ۲ بار با بفر فسفات به مدت ۵ دقیقه شسته شد و به مدت ۶۰ دقیقه در تتراکسید اوسمیوم قرار گرفت. با استفاده از غلظت های مختلف اتانول (۱۰۰-۲۵٪)، نمونه آگیری و با آگارز ثابت شد. در مرحله بعد، نمونه به وسیله Richert Ultramicrotome برش داده شد و با استات اورانیل و سرب سترات رنگ آمیزی و به وسیله میکروسکوپ الکترونی (هی تاچی HU-12A) مشاهده گردید.

بعد از استخراج سیناپتوزوم، از روش المان برای بررسی فعالیت آنزیم کولین استراز استفاده شد (۱۴). اندازه گیری فعالیت کاتالیتیکی آنزیم به وسیله افزایش و تولید آنیون زرد رنگ ۵- تیو ۲- نیترو بنزوئیک با اندرکنش تیو کولین با معرف DTNB (۵، ۵' دی تیویس، ۲- نیترو بنزنیک اسید) صورت گرفت. میزان جذب در ۴۱۲ نانومتر تعیین شد (۶)، و فعالیت آنزیم از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{Enzyme activity} = \frac{da}{dt} \varepsilon L \quad (1)$$

نتایج براساس میانگین \pm انحراف معیار و به صورت نمودار بیان شدند. داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و آزمون تی استیودنت تجزیه و تحلیل شدند و سطح معنی داری، $p < 0.05$ در نظر گرفته شد. نمودار فعالیت آنزیم استیل کولین استراز به کمک Excle ترسیم شد.

ماز به علاوه ای شکل مرتفع، از جنس چوب و دارای چهار بازو به شکل علامت به علاوه (+) است و ابعاد بازوی باز و بسته، ۵۰ در ۱۰ می باشد که در دو طرف و انتهای بازوی بسته، دیوارهایی به بلندی ۴۰ سانتی متر قرار دارد. برای جلوگیری از سقوط موش، در دو طرف و انتهای بازوی باز، لبه هایی به ارتفاع یک سانتی متر تعبیه شده است. چهار بازو به یک محدوده مرکزی ۱۰ در ۱۰ سانتی متری منتهی می شوند. ماز به وسیله پایه هایی در ارتفاع ۵۰ سانتی متری از سطح زمین قرار می گیرد و نور مناسب به وسیله یک لامپ ۶۰ واتی که از طرف یک بازوی بسته به ماز تابیده شده، تأمین می گردد.

برای انجام تست های رفتاری، موش ها به طور جداگانه در مرکز ماز به علاوه ای شکل رو به بازوی باز قرار گرفتند و به آنها اجازه داده شد به مدت ۵ دقیقه آزادانه به جستجو پردازند. در این مدت، دوربینی که در بالای ماز قرار داشت، حرکات حیوان را ثبت می کرد. همچنین تعداد دفعات ورود حیوان به بازوی باز، تعداد دفعات ورود حیوان به بازوی بسته، مدت زمان ماندن حیوان در بازوی باز و مدت زمان ماندن حیوان در بازوی بسته (منظور از ورود به بازوی باز یا بسته، قرار گرفتن هر چهار پای حیوان در بازوی مورد نظر است). تعداد ورود به بازوی باز و مدت زمان ماندن در بازوی باز براساس فرمول زیر محاسبه گردید. (۱۰۰ × نسبت ورود به بازوی باز به مجموع ورود به بازوهای باز و بسته) = درصد تعداد ورود به بازوی باز (۱۰۰ × نسبت زمان صرف شده در بازوهای باز به مجموع زمان صرف شده در بازوهای باز و بسته) = درصد مدت زمان سپری شده در بازوی باز

در ادامه، رت ها با استفاده از کلروفورم بیهوش و خونگیری به طور مستقیم از قلب آنها انجام شد. برای جدا کردن سرم خون، نمونه خونی، سانتریفوژ و به وسیله کیت حیوانی (Bumirix ساخت کشور فرانسه) به روش ELISA اندازه گیری شد.

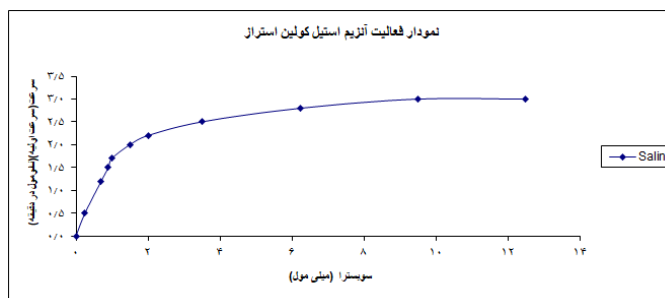
سیناپتوزوم به وسیله سانتریفوژ گرادیان سوکروز با استفاده از روش Dodd و همکاران تهیه گردید (۱۱، ۱۲)، سپس از قشر مغز موش برای آماده سازی سیناپتوزوم استفاده شد. در ادامه، قشر مغز خارج و با پاترموتور تفلون شیشه ای هموژنایزر (۸۰۰ دور در دقیقه) هموژنایز شد.

دقیقه به‌ازای هر میلی‌لیتر و در گروه THC، یک نانومول در دقیقه

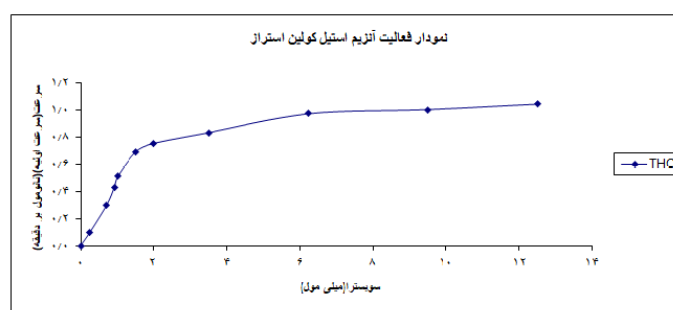
به‌ازای هر میلی‌لیتر بود (نمودار شماره ۱).

در این مطالعه سرعت ماکزیمم در گروه سالین، ۲/۲ نانومول در

(الف)



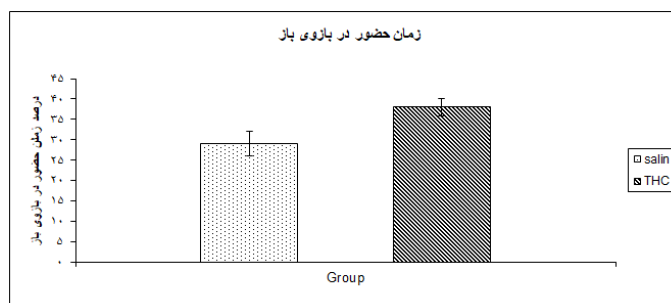
(ب)



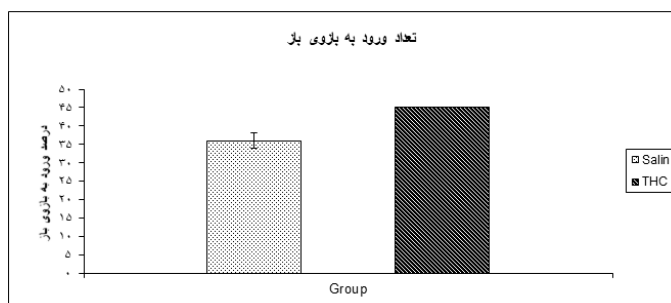
نمودار شماره ۱: نمودار کنتیگی فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در غلظت‌های مختلف سوپسترا (بین ۰/۵-۱۲ میکرومولار).
الف) گروه سالین، ب) THC.

براساس آزمون تی استیودنت، در رت‌های در معرض THC، نسبت به گروه سالین افزایش داشت که نشان‌دهنده یک برانگیختگی درصد زمان حضور و درصد تعداد ورود به بازوی باز ($p < 0/05$) رفتاری ناشی از اضطراب‌زا بودن THC بود (نمودار شماره ۲).

(الف)

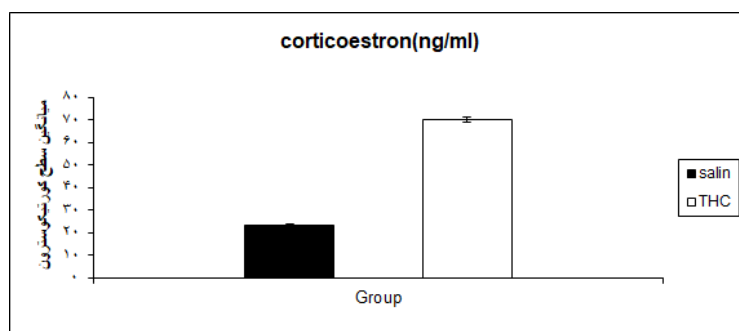


(ب)



نمودار شماره ۲: الف) درصد زمان سپری شده در بازوی باز؛ ب) درصد تعداد ورود به بازوی باز. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده است. علامت* نشان‌دهنده معنی‌دار بودن نتایج در گروه THC نسبت به سالین می‌باشد ($p < 0/05$).

همچنین تزریق داخل بطنی THC باعث افزایش سطح هورمون کورتیکوسترون و تفاوت معنی داری بین گروه‌های سالین با THC (شماره ۳). شد ($p < 0.05$)، که نشان‌دهنده استرس و اضطراب بود (نمودار



نمودار شماره ۳: میزان هورمون کورتیکوسترون در گروه سالین و THC.

نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده است. علامت * نشان‌دهنده معنی دار بودن نتایج در گروه THC نسبت به سالین می‌باشد ($p < 0.05$).

جدول شماره ۱: میانگین تست رفتاری با ماز به علاوه‌ای شکل به تفکیک گروه

گروه	تعداد	درصد زمان حضور در بازوی باز	درصد تعداد ورود به بازوی باز
سالین	۵	۲۹ ± ۳ / ۳۰ ± ۳	۳۵ ± ۲
THC	۵	۳۸ / ۰۱ ± ۲ / ۰۹	۴۵ ± ۰

نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده است.

جدول شماره ۲: میانگین سطح هورمون کورتیکوسترون به تفکیک گروه

گروه	تعداد	میانگین \pm انحراف معیار
سالین	۵	۲۳ ± ۱ / ۰۱
THC	۵	۷۰ ± ۱

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق در مورد تأثیر THC بر فعالیت آنزیم کولین استراز در شرایط آزمایشگاهی نشان داد در صورت تزریق THC به رت‌ها، فعالیت آنزیم استیل کولین استراز نسبت به گروه سالین کاهش می‌یابد (نمودار شماره ۱). سرعت ماکزیمم در گروه THC نیز نسبت به گروه سالین کمتر بود. تتراهیدروکانابینول با اتصال به گیرنده‌های کانابینوئیدی موجود در مناطق مختلف مغز (هیپوکامپ، کورتکس و مخچه)، ارتباط عادی مغز را تغییر می‌دهد. پیام‌های شیمیایی که به وسیله نوروترانسمیترها بین سلول‌های عصبی (نورون‌ها) به سراسر سیستم عصبی منتقل می‌شوند، می‌توانند با کاهش فعالیت آنزیم استیل کولین استراز و مهار جذب نوروترانسمیترها به گیرنده‌ها باعث فعال شدن فرآیند ناشی از کارکرد نوروترانسمیترهای مربوطه آنها شوند که در نتیجه باعث اختلال در توابع مختلف جسمی و روانی (از جمله حافظه، تفکر، تمرکز، حرکت، هماهنگی، ادراک حسی و زمان) خواهند شد.

نتایج حاصل از آزمون به علاوه‌ای شکل نشان داد زمان حضور در بازوی باز (نمودار شماره ۲- الف) و تعداد ورود بازوی باز (نمودار شماره ۲- ب) در گروه THC نسبت به گروه سالین افزایش می‌یابد که این افزایش فعالیت، نشان‌دهنده یک نوع اضطراب و برانگیختگی در رفتار رت‌ها می‌باشد. دوپامین یک انتقال‌دهنده عصبی اصلی در فعالیت حرکتی است، همچنین نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی برانگیختگی ایفا می‌کند. افزایش فعالیت حرکتی به افزایش غلظت دوپامین در مغز نسبت داده شده است (۱۵). از آنجایی که THC به عنوان یک ماده دوپامینونرژیک، با اثر بر روی رسپتورهای D2 دوپامینی بر فرآیند داخل سلولی اثر می‌گذارد و باعث کاهش کلسیم داخل سلولی می‌شود؛ این کاهش به واسطه فسفولیپاز C موجب باز شدن کانال پتاسیم می‌گردد. همچنین باز شدن کانال پتاسیم سبب وقوع دپولاریزاسیون و در حقیقت فعال شدن نورون‌های مربوطه می‌شود (۱۶). از آنجایی که فعالیت رسپتورها D2 سبب کاهش رهایش گابا می‌شود؛ در نتیجه می‌تواند موجب اضطراب ناشی از برانگیختگی

باتوجه به اینکه CRF به طور مستقیم به واسطه پاسخ ACTH به THC درگیر است (۲۴)؛ در نتیجه موجب بالا رفتن سطح هورمون کورتیکوسترون می‌شود. از سوی دیگر، تتراهیدروکانابینول با تأثیر بر محور HPA، می‌تواند در ساخت و ترشح انتقال‌دهنده عصبی آمین بیوژنیک تغییر ایجاد کند؛ مانند اپی نفرین که سبب ترشح قسمت مرکزی آدرنال می‌شود (۲۵). بسیاری از انتقال‌دهنده‌های عصبی (مانند نوراپی نفرین، سروتونین، استیل کولین، هیستامین و GABA)، نقش مهمی در تنظیم ترشح CRF دارند (۲۶، ۲۷). علاوه بر این، این افزایش هورمون به واسطه گیرنده کانابینوئید صورت می‌گیرد. همچنین سیستم کانابینوئید درون‌زا، ممکن است نقش فیزیولوژیکال در کنترل ترشح هورمون محور HPA داشته باشد. گیرنده کانابینوئیدها در مناطق مختلف مغز، از جمله ساختار لیمبیک قرار دارد و محور HPA را تنظیم می‌کند. گیرنده‌های ناحیه هیپوکامپ نیز در هسته پاراونتیکولار هیپوتالاموس قرار دارند.

اهمیت این جایگاه مغز به واسطه اثر تحرکی THC بر محور HPA بوده که موجب افزایش کورتیکوسترون می‌شود (۲۸).

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد تتراهیدروکانابینول باعث بروز رفتارهای اضطرابی و کاهش فعالیت آنزیم کولین استراز می‌شود که این نتیجه می‌تواند یک مبنای نورفیزیولوژی برای توجیه رفتارهای اضطرابی ناشی از تزریق THC باشد.

رفتاری نیز گردد (۱۷، ۱۸). از سوی دیگر، THC با تأثیر بر سیستم عصبی مرکزی و مهار آنزیم کولین استراز موجب تغییراتی در سطح انتقال‌دهنده عصبی مانند استیل کولین می‌شود (۱۹، ۲۰). همچنین استیل کولین به واسطه دو گیرنده (نیکوتین و موسکارینی) بر سیستم عصبی اثر می‌گذارد و هر دو این گیرنده‌ها نیز در رفتار اضطرابی نقش دارند. گیرنده‌های پیش‌سیناپسی نیکوتین، رهایش چند انتقال‌دهنده عصبی در مغز را کنترل می‌کنند (۲۱)؛ در نتیجه این احتمال وجود دارد که گیرنده نیکوتینی به واسطه تغییر در رهایش نوروترانسمیترها (مانند نوراپی نفرین، استیل کولین، دوپامین و GABA) رفتار اضطرابی را تحت تأثیر قرار دهد (۲۱). به علاوه، این گیرنده در هایپوکامپ نیز باعث افزایش رهایش سروتونین و فعال شدن گیرنده‌های سروتونین، به خصوص $5HT1A$ شده و سبب رفتار اضطرابی می‌شود (۱۸).

در مطالعه حاضر، تتراهیدروکانابینول باعث افزایش هورمون کورتیکوسترون شد (نمودار شماره ۳). همچنین براساس نتایج مطالعات، THC با تأثیر بر روی محور HPA سبب تغییرات اندوکرین از طریق تحریک عملکرد آدرنو کورتیکوتروپین و ترشح کورتیکوسترون می‌شود (۲۲). ترشح اصلی ACTH از CRF-41 بوده که به وسیله نورون‌های پاراسلولار در هسته پاراونتیکولار هیپوتالاموس ساخته می‌شود (۲۲). تزریق THC نیز با تأثیر بر روی هیپوتالاموس، مقدار CRF-41 در داخل برجستگی میانی هیپوتالاموس را کاهش می‌دهد، کاهش این هورمون اثر فیدبکی روی CRF گذاشته و باعث ترشح آن به داخل سیستم وریدی می‌گردد (۲۳).

References:

1. Tinklenberg JR, Melges FT, Hollister LE, Gillespie HK. Marijuana and immediate memory. *Nature*. 1970;226:1171-2. Link
2. Clark LD, Hughes R, Nakashima EN. Behavioral effects of marihuana: Experimental studies. *Arch Gen Psychiatry* 1970;23(3):193-8. Link
3. Acquas E, Pisanu A, Marrocu P, Goldberg SR, Di Chiara G. Δ 9-tetrahydrocannabinol enhances cortical and hippocampal acetylcholine release in vivo: A microdialysis study. *Eur J Pharmacol* 2001;419(2):155-61. Link
4. Zarrindast MR, Ghiasvand M, Rezayof A, Ahmadi S. The amnesic effect of intra-central amygdala administration of a cannabinoid CB1 receptor agonist, WIN55, 212-2, is mediated by a beta-1 noradrenergic system in rat. *Neuroscience* 2012;212:77-85. PubMed
5. Schafe GE, Doyère V, LeDoux JE. Tracking the fear engram: The lateral amygdala is an essential locus of fear memory storage. *J Neurosci* 2005;25(43):10010-4. PubMed
6. del Rosario CN, Pacchioni AM, Cancela LM. Influence of acute or repeated restraint stress on morphine-induced locomotion: involvement of dopamine, opioid and glutamate receptors. *Behav Brain Res* 2002;134(1):229-38. PubMed
7. Hall JE. Guyton and Hall textbook of medical physiology. 13th ed. Mississippi: Elsevier Health Sciences; 2015. Link
8. Longo V. Behavioral and electroencephalographic effects of atropine and related compounds. *Pharmacol Rev* 1966;18(2):965-96. PubMed
9. Mishima K, Egashira N, Hirosawa N, Fujii M, Matsumoto Y, Iwasaki K, et al. Characteristics of Learning and Memory Impairment Induced by Δ 9-Tetrahydrocannabinol in Rats. *Jpn J Pharmacol* 2001;87(4):297-308. PubMed
10. Mishima K, Egashira N, Matsumoto Y, Iwasaki K, Fujiwara M. Involvement of reduced acetylcholine release in Δ 9-tetrahydrocannabinol-induced impairment of spatial memory in the 8-arm radial maze. *Life Sci* 2002;72(4):397-407. Link
11. Dodd PR, Hardy JA, Oakley AE, Edwardson JA, Perry EK, Delaunoy JP. A rapid method for preparing synaptosomes: Comparison, with alternative procedures. *Brain Res* 1981;226(1):107-18. PubMed
12. Dodd P, Hardy JA, Oakley AE, Strong AJ. Synaptosomes prepared from fresh human cerebral cortex; morphology, respiration and release of transmitter amino acids. *Brain Res* 1981;224(2):419-25. PubMed
13. Bai F, Witzmann FA. Synaptosome proteomics. *Subcell Biochem* 2007;43:77-98. PMC
14. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82(1):70-7. PubMed
15. Cenci MA. Dopamine dysregulation of movement control in L-DOPA-induced dyskinesia. *Trends Neurosci* 2007;30(5):236-43. PubMed
16. Stoof JC, Keabian JW. Two dopamine receptors: biochemistry, physiology and pharmacology. *Life Sci* 1984;35(23):2281-96. PubMed
17. Gallagher JP, Higashi H, Nishi S. Characterization and ionic basis of GABA-induced depolarizations recorded in vitro from cat primary afferent neurones. *J Physiol* 1978;275:263. PubMed
18. White FJ, Kalivas PW. Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. *Drug Alcohol Depend* 1998;51(1):141-53. PubMed
19. Balerio GN, Aso E, Maldonado R. Involvement of the opioid system in the effects induced by nicotine on anxiety-like behaviour in mice. *Psychopharmacology* 2005;181(2):260-9. PubMed

20. Janhunen S, Ahtee L. Differential nicotinic regulation of the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways: Implications for drug development. *Neurosci Biobehav Rev* 2007;31(3):287-314. PubMed
21. O'Neill AB, Brioni JD. Benzodiazepine receptor mediation of the anxiolytic-like effect of (-)-nicotine in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1994;49(3):755-7. Link
22. Antoni FA. Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: Advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. *Endocr Rev* 1986;7(4):351-78. PubMed
23. Chappell PB, Smith MA, Kilts CD, Bissette G, Ritchie J, Anderson C, et al. Alterations in corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in discrete rat brain regions after acute and chronic stress. *J Neurosci* 1986;6(10):2908-14. PubMed
24. Weidenfeld J, Feldman S, Mechoulam R. Effect of the brain constituent anandamide, a cannabinoid receptor agonist, on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat. *Neuroendocrinology* 1994;59(2):110-2. PubMed
25. Pechnick RN. Effects of opioids on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1993;33(1):353-8. PubMed
26. Tuomisto J, Männistö P. Neurotransmitter regulation of anterior pituitary hormones. *Pharmacol Rev* 1985;37(3):249-332. PubMed
27. Jones MT, Hillhouse EW, Burden J. Effect of various putative neurotransmitters on the secretion of corticotrophin-releasing hormone from the rat hypothalamus in vitro—a model of the neurotransmitters involved. *J Endocrinol* 1976;69(1):1-10. PubMed
28. Manzanares J, Corchero J, Fuentes JA. Opioid and cannabinoid receptor-mediated regulation of the increase in adrenocorticotropin hormone and corticosterone plasma concentrations induced by central administration of Δ 9-tetrahydrocannabinol in rats. *Brain Res* 1999;839(1):173-9. PubMed